

Arbeiten des pflanzenphysiologischen Institutes der k. k. Wiener
Universität.

II. Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe.

Von Emil Schumacher aus Luzern.

(Vorgelegt in der Sitzung vom 11. Juni 1874.)

I.

Über die Vermehrung der Hefe durch endogen entstehende Zellen (Reess' Ascosporen).

Bekanntlich hat Reess¹ unsere Kenntnisse über die Morphologie der Hefe durch eine wichtige Entdeckung erweitert, indem er eine neue Vermehrungsweise der Hefe auffand. — Er beobachtete nämlich, dass Hefezellen, wenn sie auf bestimmten Substraten im feuchten Raume oder unter anderen, später näher zu bezeichnenden Verhältnissen gezogen werden, in ihrem Innern 2 bis 4 neue Zellen bilden, aus welchen in gährungsfähiger Flüssigkeit durch Sprossung wieder ganz normale Hefezellen hervorgehen.

Reess findet, dass diese endogen entstehenden Zellen Produkte freier Zellbildung sind, deutet dieselben als *Ascosporen* und stellt, in Consequenz dieser Annahme, den Alkoholgährungspilz als *Saccharomyces cerevisiae* Meyen zu den Ascomyceten.

An der Richtigkeit der Beobachtung, dass unter bestimmten Bedingungen in den Zellen der Alkoholhefe endogen neue Zellen entstehen, sofern diese Wahrnehmung sich auf Bierhefe bezieht, ist wohl nicht mehr zu zweifeln, nachdem Brefeld² und noch

¹ Bot. Zeitung 1869, pag. 104. — Ausführlicher in: Bot. Untersuchung über d. Alkoholgährungspilze. Leipzig 1870.

² Flora 1873, Nr. 25. — A. Mayer theilt in seiner jüngst erschienenen Gährungschemie die Reess'sche Ansicht. pag. 83.

andere Beobachter dasselbe Factum constatirten. Die Zweifel, welche von Eidam¹ in dieser Beziehung erhoben wurden, belehren uns wohl nur darüber, dass es nicht so einfach und leicht ist, die Bildung der Ascosporen hervorzurufen.

Die Auffassung, dass die endogen entstehenden Zellen *Ascosporen* seien und mithin *Saccharomyces cerevisiae* zu den Ascomyceten zu stellen wäre, blieb nicht ohne Widerspruch,² allein die Beantwortung dieser, die systematische Stellung des Hefepilzes betreffenden Frage, lag nicht im Plane der vorliegenden Arbeit, und wenn ich, der Bequemlichkeit des Ausdruckes halber, im Nachfolgenden von Ascosporen des Hefepilzes spreche, so soll damit nicht gesagt sein, dass ich die Reess'sche Auffassung über die systematische Stellung von *Saccharomyces cerevisiae* theile.

Die Aufgabe, welche ich mir stellte, bestand vielmehr darin, nachzusehen, ob der die Brauntweihefe (Presshefe) zusammensetzende Gährungspilz, mit welchem Reess keine eingehenden Untersuchungen anstellte, überhaupt Ascosporen zu bilden fähig ist oder nicht, und im ersteren Falle, unter welchen Verhältnissen dies stattfindet.

Ehe ich aber in die Details meiner Untersuchungen eingehe, scheint es mir an dieser Stelle nicht überflüssig zu sein, darauf hinzuweisen, was denn eigentlich Presshefe ist, zumal selbst Reess im Irrthum über das Wesen dieser Hefeform sich befindet.

Es lässt sich gegen die Ansage von Reess,³ dass die Presshefe eine Obergährungsvarietät von *Saccharomyces cerevisiae* sei, allerdings nichts einwenden, dass aber diese Hefeform als ein relativ wasserarmes, durch ein Conservirungsverfahren erzeugtes Product ist, wie Reess⁴ angibt, beruht auf einem Irrthum. Denn die Presshefe ist, wie technologischerseits hinlänglich bekannt, nichts Anderes als eine Brauntweihefe, bei deren Fabrication nur darauf Rücksicht genommen wurde, möglichst viel Hefe zu

¹ Der gegenwärtige Standpunkt der Mycologie mit Rücksicht auf die Lehre von den Infectionskrankheiten. Berlin 1871, pag. 30.

² Brefeld, Flora 1873, Nr. 25.

³ Alkoholgährungspilze pag. 21.

⁴ „ pag. 5. Anm

erzielen; der Branntwein hat bei der Presshefefabrication nur die Bedeutung eines Nebenproductes. Die Hefezellen der Presshefe besitzen den reellen Wassergehalt, den sie in der Gährflüssigkeit hatten, denn bei der Abscheidung der Presshefe wird nur die mechanisch adhärende Flüssigkeit möglichst beseitigt, und nichts von dem den Hefezellen eigenen Wasser entfernt.

Es schien mir der Vollständigkeit halber nothwendig, neben den Culturversuchen, die ich mit Presshefe anstellte, auch solche mit Bierhefe vorzunehmen, um die etwaigen Unterschiede dieser beiden Hefeformen in Betreff ihrer endogenen Zellbildung kennen zu lernen.

Zu den Versuchen nahm ich nicht nur aus zuverlässigen Händen bezogene und von allen Fälschungen freie Bier- und Presshefe, sondern benützte auch für einzelne Versuche Hefe, die ich aus den beiden genannten Materialien in Pasteur'scher Flüssigkeit¹ gezogen hatte, und ferner vorsichtig an der Luft getrocknete Bier- und Branntweinhefe (Presshefe).

Lufttrockene Hefe zog ich darum in den Versuch hinein, da dieselbe nach den Untersuchungen von Hoffmann² und Wiesner³ lange Zeit nach dem Trocknen noch aus lebenden Zellen besteht, und es deshalb wünschenswerth schien zu erproben, ob nicht vielleicht die lufttrocken gewordenen Hefezellen leichter in die Ascusform umgewandelt werden können als die wasserhaltigen.

Es dienten somit als Untersuchungsmaterialien:

1. Frische Bierhefe,
2. Lufttrockene Bierhefe,
3. Frische Presshefe,
4. Lufttrockene Presshefe.

¹ Auf 1000 G. Wasser 100 Gr. Kandiszucker, 1 Gr. rechts weinsanres Ammoniak und die Asche von 10 Gr. Hefe.

² Bot. Unters. aus dem physiol. Laborat. d. landw. Lehranstalt in Berlin, herausgegeben von H. Karsten. Bd. I. p. 359.

³ Mikroskopische Unters. etc. Herausgegeben v. Prof. Dr. J. Wiesner, Stuttgart 1872, p. 114, und Sitzungsberichte der kais. Akad. d. Wissensch. zu Wien. Math. nat. Classe, II. Abth., Märzheft 1869.

Anfänglich hielt ich mich bei den Culturversuchen streng an die von Reess gegebenen Vorschriften. Nachdem dieselben aber, namentlich bei Presshefe, nicht zu den gewünschten Resultaten führten, sah ich mich genöthigt, in einzelnen Versuchen hievon abzugehen.

1. Versuche mit frischer Bierhefe.

Zur Untersuchung diente frische, direct aus der Brauerei gekommene Unterhefe, welche ich dem Herrn Kuffner, Brauhausbesitzer in Ottakring und Döbling bei Wien, und Herrn Meichel, Brauhausbesitzer in Simmering bei Wien, verdankte.

Die mikroskopische¹ Untersuchung ergab, dass alle verwendeten Proben frei von fremden Zusätzen waren.

Die Hefe wurde vor jedem Versuche, wie es die von Reess gegebene Vorschrift forderte, mit destillirtem Wasser gewaschen und absitzen gelassen. Die so gereinigte Hefe wurde nun auf folgende feste Substrate gesäet: auf frische und gekochte Kartoffel, auf frische und gekochte Möhre (*Daucus Carota*).

Die Aussaaten wurden, unter den von Reess angegebenen Vorsichten, im feuchten Raume stehen gelassen und Tag für Tag die vor sich gegangenen Veränderungen mikroskopisch festgestellt.

Die sämmtlichen Versuche wurden in einem Raume des pflanzen-physiologischen Institutes der k. k. Universität in Wien innerhalb der Monate November 1873 bis Ende April 1874 ausgeführt, dessen Temperatur innerhalb der Versuchszeit nicht unter 14° C. fiel und nicht über 18° C. sich erhob.

„Reess² schildert nun die Entstehung der Aseosporen in folgender Weise:

„Bei diesen Culturen (auf den Substraten nämlich) verhält sich Bierunterhefe während der ersten 2 bis 3 Tage ebenso, wie in einer gährungsfähigen Lösung schwacher Concentration. Die

¹ Sämmtliche Beobachtungen wurden gemacht mit einem Mikroskop von Seubert u. Kraft $\frac{\text{Obj. V}}{\text{Oc. 3}}$. [Vergröss. 610].

² Alcoholgährungspilze p. 9.

wasserreichen, grosse Vacuolen bergenden Zellen des *Saccharomyces cerevisiae* sprossen — wie zu Ende einer Hauptgärung — langsam, doch ohne Unterbrechung weiter, so dass binnen 24 Stunden der Rand der Hefeschicht ringsum $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Millimeter mit welligen Ausbuchtungen durch Zuwachs vorrückt. Die einzelnen Zellen sind meist von rundlicher, ovaler, selten von elliptischer und kurz fadenförmiger Gestalt.

Ein Auswachsen der *Saccharomyces*zellen zu Myceliumfäden irgend welcher Art findet niemals statt, auch wenn alle Bedingungen für derartige Pilzvegetationen gegeben sind.

Mit dem dritten Tage nimmt die Vegetation des Biergärungspilzes allmählig ab; am vierten liegen weitaus die meisten Zellen isolirt neben einander, ohne neue Sprossungen anzusetzen. Viele Zellen — die älteren, protoplasmaarmen — sterben ab und collabiren.

Andere schwellen sichtlich an, von 8 bis 9 Mik.¹ grössten Durchmessers auf 11 bis 14 Mik. Die grossen Vacuolen in ihnen sind geschwunden, dafür erscheint ihr gesamtes Protoplasma durch viele kleine Vacuolen und Fetttropfchen (?) gleichförmig feinschaumig. Durchschnittlich mit dem fünften und sechsten Tage differenziren sich im schaumigen Plasma gleichzeitig zwei, drei oder vier dichtere Kerne (als Zellkerne sind sie nicht sicher zu bezeichnen), um welche fast alles übrige Plasma feinkörnig sich sammelt.

So entstehen im Protoplasma 2 bis 4 individualisirte Inseln mit je einem dichten Kerne, welche nach wenigen (12 bis 24) Stunden mit je einer zarten Membran sich umgeben. Die ursprüngliche *Saccharomyces*zelle umschliesst dann, ausser ganz spärlichem, zur Tochterzellenbildung nicht verbrauchtem Mutterzellenplasma und wässerigem Zellsaft, zwei, drei oder vier rundliche, durch freie Zellbildung entstandene Tochterzellen, von 4 bis 5 Mik. Durchmesser.“

Ich kann nicht allen eben angeführten Angaben zustimmen, denn vielfach wurde von mir ein abweichendes Verhalten beobachtet.

² 1 Mik. = 1 Mikromillimeter = 0.001 Millimeter.

Dass z. B. am vierten Tage nach der Aussaat die meisten Zellen isolirt neben einander liegen sollen, ohne neue Sprossungen zu bilden, habe ich kein einziges Mal gefunden; vielmehr beobachtete ich auf einigen Substraten nach drei Wochen noch sehr häufige, auf gekochter Rübe (Möhre) einmal sogar nach sieben Wochen, dann freilich seltener, Sprossungen und Zellen mit grossen Vacuolen.

Auch eine Individualisirung des Protoplasma um dichte, vorgebildete Kerne habe ich nie bemerkt und vielmehr gefunden, dass die sich differenzirenden Plasmaportionen gleichmässig feinkörnig waren.

Als Substrate für die Hefezellen zur Erzielung endogener Zellen erwiesen sich am günstigsten frische Kartoffel und frische Möhre; die Culturen auf gekochter Kartoffel gingen stets am raschesten durch *Penicillium glaucum* und *Oidium lactis* zu Grunde. Auch entwickelte sich auf diesem Substrate oft schon nach drei oder vier Tagen ein starker Geruch (demjenigen des Trimethylamins sehr ähnlich) unter gleichzeitig massenhaftem Auftreten von Bacterien. Kein anderes Substrat zeigte diese Erscheinung.

Die Ascosporen erschienen auf frischen Kartoffeln einmal am neunten Tage, auf frischer Rübe am dreizehnten nach der Aussaat.

Versuche, die Sporenbildung bei mehrfach ausgewaschener Hefe in destillirtem Wasser oder in täglich abgeschwächten Zuckerslösungen hervorzurufen,¹ gaben stets ein negatives Resultat. Viele solcher Culturen gingen trotz der Vorsicht, welche gebraucht werden musste, um atmosphärische Verunreinigungen auszuschliessen, nach 2 bis 3 Wochen zu Grunde, ohne dass auch nur eine Andeutung von Ascosporenbildung beobachtet werden konnte; andere hielten sich unverdorben 5 bis 6 Wochen unter steter Sprossung. Die einzige sichtbare Veränderung, die die Hefezellen durch solche Behandlung erlitten, war, dass das Protoplasma regelmässig grobkörnig wurde, auch das Protoplasma solcher Zellen, die noch eine grosse Vacuole enthielten.

¹ Alkoholgährungspilze p. 13.

Die Möglichkeit der Sporenbildung bei solchen Culturen sei durch diese negativen Resultate meiner Untersuchungen durchaus nicht bestritten, sondern es soll dadurch nur von Neuem auf das Unzuverlässige derartiger Züchtungsversuche hingedeutet werden.

2. Versuche mit lufttrockener Bierhefe.

Zu diesen Versuchen wurde frische Bierhefe sorgfältig ausgewaschen, dann auf Filterpapier gestrichen und unter einer schützenden Gloeke das Wasser der Hefe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (16° C.) zur Verdunstung gebracht. Nach einigen Tagen wurde sie trocken, krustenförmig und hatte eine dunkelbraune Farbe angenommen. In 10% Zuckerlösung präparirt, zeigte sich das Protoplasma körnig, vacuolenlos; erst nach längerem Liegen in der Zuckerlösung entstanden im Innern einzelner Zellen wieder normale Vacuolen.

Solche Hefe wurde nun auf die Substrate ausgesät, und zwar: auf frische und gekochte Kartoffel, auf frische und gekochte Möhre.

Nach zwei Tagen war die aufgestreute Hefe vollständig erweicht, ja auf den frischen Substraten ganz zerflossen; Vacuolen traten wieder auf, ebenso Sprossungen, das körnige Wesen des Protoplasma aber blieb constant.

Obwohl ich mehrere Versuche in dieser Richtung machte, gelangte ich doch stets zu negativen Resultaten. Es ist demnach die lufttrockene Bierhefe, obgleich sie aus lebenden Zellen besteht,¹ doch zur Überführung in die Ascusform nicht geeignet.

¹ Hoffmann spricht sich (Bot. Unters. l. c. p. 359) in Betreff der Dauer der Gährkraft an der Luft getrockneter Hefe folgendermassen aus: „In diesem Zustande kann man die Hefe (wie es scheint beliebig lange) aufbewahren, ohne dass sie dabei merklich von ihrer Gährkraft einbüsst.“

Wiesner gibt in seinen Untersuchungen über den Einfluss, welchen Zufluss und Entziehung von Wasser auf die Lebensthätigkeit der Hefezellen äussern (Mikrosk. Unters. l. c.) an, dass Hefe, deren Wassergehalt etwa 13% beträgt, durch acht Monate hindurch sich lebend erhält, indem die Zellen einer so lang in diesem Zustand aufbewahrten Hefe in verdünnter Zuckerlösung sprossen und intensive Gährung hervorgerufen.

3. Versuche mit frischer Presshefe.

Über eine etwaige Überführung der Zellen der Presshefe in die Ascusform hat Reess, wie schon oben angeführt wurde, keine eingehenden Versuche angestellt.¹

Die einzige hierüber bekannt gewordene Beobachtung wurde gelegentlich von Wiesner² gemacht. Er gibt an, dass bei Culturen der Presshefe, nach den von Reess für Bierhefe gegebenen

Auf längere Zeiträume hinaus hatte Herr Prof. Dr. Wiesner seine Versuche nicht ausgedehnt. Wohl aber bewahrte er in Gefässen, welche gegen den Zutritt atmosphärischer Keime völlig abgesperrt waren, lufttrockene Presshefe seit Jahren auf, welche er mir zu weiteren Versuchen gefälligst überliess. — Ich erhielt 2 Proben; die eine wurde in frischgetrocknetem Zustand im August 1869, die andere in eben demselben Zustand im November 1870 eingeschlossen. — Die Versuche wurden mit beiden im März 1874 angestellt, selbstverständlich unter Berücksichtigung der nöthigen Vorsichtsmassregeln zum Ausschluss atmosphärischer Keime.

Erstere, welche also durch 4 Jahre und 9 Monate aufbewahrt wurde, brachte weder Gährung hervor, noch liess sich in Zuckerlösung Sprossung constatiren. — In Wasser präparirt, zeigten die Zellen dieser Hefe meist elliptische Form, immer körniges Protoplasma, arretirte Sprossungen und lebende Bacterien. — Auch die zweite Hefe, welche also ein Alter von 3 Jahren und 4 Monaten aufwies, liess keine Sprossbildung der Hefezellen erkennen und zeigte, in Wasser präparirt, das nämliche Bild wie die Hefe von 1869.

Wohl trat bei der zweiten Hefe nach einiger Zeit Gährung ein; da aber gleichzeitig die Bildung eines Mucormyceliums stattfand, so liess sich nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die Gährung von der gewöhnlichen Hefe oder von Mucorhefe herrührte.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass Hefezellen nach 4jähriger Aufbewahrung sich als völlig getödtet und überhaupt als unfähig zur Einleitung von Gährung erweisen, dass hingegen Mucorsporen (und Bacterien) diese mehrjährige Aufbewahrung lebend überdauern. Ob gewöhnliche Hefe nach dreijähriger Aufbewahrung noch als lebend anzusehen ist, bleibt hingegen noch zweifelhaft.

Es ist noch zu bemerken, dass auch aus der erstgenannten Hefe bei Abschluss atmosphärischer Keime in Zuckerlösung sich ein Mycelium entwickelte, dessen Auftreten jedoch von Gährung nicht begleitet war.

¹ Alkoholgährungspilze p. 20.

² Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 1873. p. 822. — Auch in: Archiv der Pharmacie. 1874, I. B., 5. H. p. 420.

Vorschriften behufs Einleitung der Ascosporenbildung unter Hunderten von Hefezellen nur einzelne Asci zur Entwicklung kamen. Er hält auf Grund dieser Versuche die Frage über die Identität der Bier- und Branntweinhefe noch für unerledigt, indem er das bloß sporadische Auftreten der Asci nicht für genügend beweiskräftig erachtet. Diese Auffassung ist um so berechtigter, als erwiesenermaßen käufliche Presshefe manchmal mit Bierhefe verfälscht ist.

Die nachfolgenden von mir angestellten Versuche werden lehren, dass die Presshefe allerdings mit der Bierhefe als sehr nahe verwandt aufgefasst werden müsse, da auch die erstere Ascosporenbildung zeigt; wesshalb die von Reess ausgesprochene Vermuthung, die Branntweinhefe sei eine Culturvarietät von *Saccharomyces cerevisiae*, berechtigt erscheint. Freilich wird sich aber auch herausstellen, dass die Bedingungen für die Erziehung der Asci aus Presshefe etwas verschieden sind von denjenigen, unter welchen die Bierhefe zur Ascosporenbildung gelangt.

Zum Versuche wurde theils frische, völlig reine, unverfälschte Hefe, die ich aus zuverlässigen Händen bezog, theils eine Hefe angewendet, die ich mir aus dem obengenannten Materiale in Pasteur'scher Flüssigkeit gezogen hatte.

Beiderlei Materialien waren so rein, dass ein Auswaschen sich nicht als nöthig erwies. Ich unterliess diese Operation um so lieber, als ja die Untersuchungen Wiesner's¹ lehren, welch' schädigenden Einfluss rasche Wasserzufuhr auf die Lebensfähigkeit der Presshefe übt.

Die Hefe wurde dann in dünner Schicht direct auf das Substrat gebracht und in den feuchten Raum gegeben. Als Substrate dienten: frische und gekochte Kartoffel, frische und gekochte Möhre, Schwarzbrot und Citrone.

Das Verhalten der Culturen auf diesen Substraten war nicht ganz gleich und es zeigte sich, dass auf den frischen die Schimmelpilze stets später auftraten, als auf den gekochten.

¹ Mikrosp. Unters. I. e. 115.

Im Allgemeinen verliefen die Culturen, wie folgt:

Auf den gekochten Substraten zeigte nach 24 Stunden die Hefeschicht schon ersichtliches Wachstum; auf frischen Substraten war sie nach dieser Zeit meist etwas eingetrocknet. Nach 2 bis 3 Tagen erschienen zahlreiche oft 5- und 6gliedrige Sprossungen. Die neuen Zellen waren meist oval (0.005 Mm. Querdurchmesser und 0.00375 Mm. Längsdurchmesser), führten bald eine grosse Vacuole, bald nur feinschaumiges Protoplasma. Am fünften oder sechsten Tage nach der Aussaat wurde das Protoplasma in fast allen Zellen körnig (oft sehr grobkörnig), ohne dass dadurch, wie es schien, die Sprossung beeinträchtigt worden wäre.

Auf frischen Substraten, wo das Körnigwerden des Protoplasma auch immer etwas früher eintrat, erfolgte nun die Differenzirung des Protoplasma und am dreizehnten Tage zeigten sich gewöhnlich die Asci (durchschnittlich von 0.00375 Mm. Durchmesser).

Bei gekochten Substraten blieb die Bildung der Ascosporen oft drei bis vier Wochen aus, während welcher Zeit die Saat ruhig weiter sprosst¹.

Auch nach dem Auftreten der Asci fand ich oft noch zahlreiche Sprossungen.

Dieses letzte Ergebniss steht somit im Widerspruch mit dem, was Reess von dem Biergährungspilz sagt, dass nämlich am vierten Tage der Cultur die meisten Zellen isolirt neben einander liegen.

Die Ascosporen traten selten zu zwei, sondern meistens als Tri- und Tetraden auf. Bei den Triaden lagen die Sporen entweder mit ihren grössten Querschnitten in der Ebene des

¹ Die Durchschnittsziffern des Erscheinens der Asci für die verschiedenen Substrate waren folgende:

Für frische	Kartoffel	13	Tage.
„ gekochte	„	33	„
„ frische	Möhre	13	„
„ gekochte	„	24	„
„ Citrone		22	„
„ Schwarzbrot		13	„

grössten Querschnittes der Mutterzelle oder aber in der Axe der Mutterzelle; bei den Tetraden war die Anordnung entweder kreuzweise oder tetraëdrisch.

Die Tochterzellen behielten meistens ihr gleichförmiges Protoplasma, selten bildeten sich in ihnen kleine Vacuolen.

Die Muttermembran verschwand nach zwei bis drei Tagen (gezählt vom Auftreten der Ascosporen) ohne dass die Sporencomplexe sich aufgelöst, oder die Sporen in ihrer gegenseitigen Lage sich geändert hätten. In gährungsfähige Medien gebracht, begann schon nach 24 Stunden eine lebhaftere Sprossung der Sporen.

Die Culturen mit selbstgezogener Hefe führten zu den nämlichen Resultaten; doch gestehe ich, dass ich bei Anwendung der gewöhnlichen käuflichen Presshefe stets sicherer auf Ascosporen rechnen konnte; der Grund hievon ist mir nicht bekannt.

In Betreff der Keimung der Ascosporen erlaube ich mir noch folgende Bemerkung:

Reess¹ sagt hierüber wörtlich Folgendes:

„Nie sah ich die Sporen am Ort ihrer Entstehung keimen, auch nicht bei genügender Wasserzufuhr. Sie keimen eben überhaupt nicht gerne, wo sie in Menge, oder mit Massen anderer Pilze zusammenliegen.“

Ich habe hingegen bei einigen Culturen, bei welchen gewöhnliche Sprossungen sehr selten mehr vorkamen, die Beobachtung gemacht, dass bei fast allen Sporencomplexen je eine noch mit den Schwesterzellen zusammenhängende Ascospore mit einer Zelle in Verbindung stand. Nach Reess würde also diese letztere primärer und die Ascosporen secundärer Natur sein. Auf das häufige Vorkommen solcher Complexe aber, bei fast vollständiger Abwesenheit gewöhnlicher Sprossungen gestützt, glaube ich eher die Ascosporen als primär und die an der einen Spore haftende Zelle als secundär ansprechen zu dürfen.

¹ Alkoholgährungspilze p. 15.

4. Versuche mit lufttrockener Presshefe.

Von jener Presshefe, welche in frischem Zustande zu den früher angeführten Versuchen diente, wurden etwa 12 Gramm in fein zerbröckeltem Zustand auf Löschpapier unter schützender Glocke liegen gelassen. Schon nach wenigen Stunden erwies sich diese Hefe als merklich spröder; nach 24 Stunden war sie ganz hart; nach achttägigem Trocknen an der Luft enthielt sie nur noch 10% Wasser.

Solche Hefe ist schmutzigbraun¹, sehr hygroskopisch, vacuolenfrei und mit körnigem Protoplasma erfüllt.

Die Culturen wurden angelegt: auf frischer und gekochter Kartoffel, auf frischer und gekochter Möhre.

Da zeigte sich vorerst, dass die trockene Presshefe aus den Substraten viel begieriger das Wasser aufnahm, als die trockene Bierhefe, denn schon nach 44 Stunden waren auf allen Substraten die ausgestreuten Hefebröckelchen vollständig zerflossen. Die kurz nach der Aussaat leicht graugelb gewordene Hefe wurde in den nämlichen 24 Stunden dunkler, es traten an den Zellen Sprossungen auf, Vacuolen bildeten sich wieder und nach 48 Stunden zeigten sich auch fünf- und sechsgliedrige „Sprossverbände“. Am zehnten Tage nahm diese lebhaftete Vegetation bedeutend ab, die mehrgliedrigen, durch Sprossung entstandenen Zellgruppen zerlegten sich in ihre Elemente, und auch die geringen Sprossungen wurden seltener. Pilze verdarben dann die Culturen. Eine einzige Cultur, auf gekochter Rübe, gestattete während 47 Tagen tägliche Untersuchung und zeigte unter den meist collabirten Zellen doch noch einzelne mit Vacuolen versehene Zellen und selbst Sprossungen.

Das Auftreten von Ascosporen konnte ich in keinem der angestellten Versuche beobachten.

So zeigen sich denn auch die Zellen der lufttrockenen Presshefe, wie die der schon erwähnten lufttrockenen Bierhefe, nach meinen Versuchen nicht geeignet, in die Ascusform überzugehen.

¹ Am besten trockener Brodkrume vergleichbar. Wiesner, mikrosk. Untersuch. I, c. p. 99.

Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich also Folgendes:

1. Die Brauntweinhefe bildet unter bestimmten äusseren Bedingungen gleich der Bierhefe sogenannte Ascosporen.

2. Die Ascosporenbildung tritt bei der Brauntweinhefe viel später ein, als unter ähnlichen Bedingungen bei der Bierhefe.

3. Als geeignetste Substrate erweisen sich für die Cultur der Brauntweinhefe behufs Hervorbringung der Ascosporen: frische Kartoffel und Schwarzbrot.

Es ist nach diesem Verhalten wohl berechtigt, die Brauntweinhefe als eine Culturform von *Saccharomyces cerevisiae* Meyen aufzufassen, wie dies von Reess bereits vermuthend ausgesprochen wurde.

II.

Über den Einfluss niederer Temperaturen auf die Lebensfähigkeit der Hefezellen.

Vor längerer Zeit hat Lüdersdorf¹ angegeben, dass es ihm gelungen sei, durch Reiben auf einer Reibplatte Hefe mechanisch zu zertrümmern. Diesem Versuche steht ein anderer der Maria Manassein² entgegen, die lufttrockene Hefe in einem Falle sechs, in einem anderen fünfzehn Stunden lang von einem kräftigen Manne mit gepulvertem Bergkrystall in einem Glasmörser reiben liess. Durch diese Proeedur wurden freilich die meisten Zellen gänzlich zerstört. Einzelne behielten aber dennoch die Fähigkeit zur Weiterentwicklung; denn wenn solche Hefe, unter den nöthigen Vorsichtsmassregeln zum Ausschluss atmosphärischer Keime, in Gährflüssigkeit versenkt wurde, so zeigte sich schon nach einigen Tagen lebhafte Gährung und auch reichliche Sprossung der Hefezellen.

¹ Bot. Zeit. 1846, p. 31. Auch Hoffmann erwähnt den Versuch von Lüdersdorf in seiner Arbeit: „Zur Naturgeschichte der Hefe“ in den bot. Untersuch. aus dem physiol. Laborat. der landwirthschaftl. Lehranstalt in Berlin. Herausgegeben von Karsten, Bd. I. 1867, p. 353.

² Mikroskop. Untersuch. ausgeführt im Laborat. für Mikroskopie etc. am k. k. polytech. Institut in Wien. Herausgegeben von Prof. Dr. J. Wiesner. Stuttgart 1872, M. Manassein: Beiträge zur Kenntniss der Hefe und zur Lehre von der alkoholischen Gährung, p. 126.

Aus letzterem Versuche ist wohl zu ersehen, dass die Hefezellen mechanischen Angriffen ausserordentlich grosse Widerstandskraft entgegenstellen.

Nach den Versuchen von Melsens¹ sollen die Hefezellen lebend einen Druck von 8000 Atmosphären überdauern.

Der Einfluss hoher Temperaturen auf Hefe war Gegenstand eingehender Untersuchungen von H. Hoffmann², Wiesner³ und Marie Manassein⁴.

Die Resultate der beiden letzteren stimmen mit denen von Hoffmann nicht ganz überein und M. Manassein schreibt diess zum Theil dem Umstande zu, dass Hoffmann mit Bier-, Wiesner und sie aber mit Brauntweihefe (Presshefe) experimentirten.

Nach Hoffmann sollen die Hefezellen beim Erwärmen in Gährflüssigkeit bei 84°C⁰ vollkommen zu Grunde gehen, beim Erwärmen in trockenem Zustande hingegen eine Temperatur von 215°C⁵ noch ertragen.

Wiesner⁷ hat gefunden, dass trockene Hefe ohne Gährflüssigkeit auf 100°C stundenlang belassen werden kann, ohne dass eine völlige Tödtung derselben eintritt.

M. Manassein operirte mit frischer und lufttrockener Presshefe, die sie im Luftbade für sich, d. h. ohne Gährflüssigkeit, erhitzte. Bei langsamem und anhaltendem Erwärmen wurden die Hefezellen der lufttrockenen Hefe erst bei einer Temperatur von 115 bis 120° getödtet (im Widerspruch mit Hoffmann).

Bei rascher, vorübergehender Wirkung der Wärme hielten solche Hefezellen noch 130°C (in 7 Minuten auf 130° erwärmt und 20 Minuten auf dieser Temperatur gehalten) aus und blieben noch sprossungsfähig. Frische Presshefe, 15 bis 45 Minuten auf

¹ Melsens. Note sur la vitalité de la levûre de bière. Comptes Rendus Tom. 70. 1870, pag. 629, oder in Hoffmann's Mycologischen Berichten 1870—71, pag. 55.

² Hoffmann. Zur Naturgeschichte der Hefe. I. c. p. 351.

³ Wiesner. Mik. Untersuch. I. c. 99.

⁴ M. Manassein. Mik. Untersuch. I. c. 116.

⁵ Hoffmann. I. c. p. 352.

⁶ Hoffmann. I. c. p. 360.

⁷ Mic. Untersuch. pag. 101.

⁸ Mikrosk. Untersuch. I. c. 123.

60°C gehalten, zeigte, in Gährflüssigkeit gebracht, noch lebhaftere Sprossung; bei 15 Minuten langer Einwirkung von 70 bis 72° waren alle Hefezellen entschieden todt.

Die höchste Temperatur, die M. Manassein auf lufttrockene Hefe einwirken liess, betrug 308° C., wobei die Erwärmung 3 Stunden 5 Minuten dauerte und die Hefe während $\frac{1}{4}$ h. einer Temperatur von 300 bis 308° C. ausgesetzt war. Auch solche Hefe gährte noch.

Es dürfte hier nicht überflüssig sein, das Resultat der Manassein'schen Arbeit anzuführen:

Todte Hefezellen haben noch die Fähigkeit, Gährung einzuleiten und eine begrenzte Zuckermenge zur Vergährung zu bringen. Lebende Hefezellen können hingegen, wenn nur die Bedingungen für ihre Entwicklung vorhanden sind, eine unbegrenzte Zuckermenge in Alkohol, Kohlensäure und die übrigen Gährungsproducte überführen.

Es ist nach M. Manassein mehr als wahrscheinlich, dass in den Hefezellen ein specifisches Ferment vorkommt, welches die Spaltung des Zuckers in die Gährproducte bedingt, ganz unabhängig davon, ob die Hefezelle lebt oder todt ist ¹.

Ueber den Einfluss niedriger Temperaturen auf Hefe liegen weniger zahlreiche Versuche vor, und genaue Angaben über das morphologische und biologische Verhalten von Hefe, die tiefen Temperaturen ausgesetzt wurde, sind bis heute nicht zur Oeffentlichkeit gelangt. Als Resultat der bis jetzt gemachten Beobachtungen ist der Satz zu betrachten: Durch Gefrieren wird das Leben der Hefe nicht vernichtet. ²

¹ Der entstandene Alkohol wurde von M. Manassein immer auf doppelte Art nachgewiesen: Zu einem Theil der filtrirten und destillirten Gährflüssigkeit wurde Schwefelsäure und chromsaures Kali gegeben und aus dem entstandenen Aldehyd auf die Gegenwart von Alkohol geschlossen. In einem andern Theile der Flüssigkeit wurde die Lieben'sche Jodoformreaction vorgenommen. (Annal. d. Chem. und Pharm. VII. Suppl. 1870, p. 219.

² Hoffmann l. c, 351.

Cagniard-Latour, Mémoire sur la fermentation vineuse, 12. Juin 1837. Ann. Chim. et Phys. II sér. Bd. 68. p. 206.

Melsens, l. c,

Ich habe mir nun zur Aufgabe gestellt, Hefe, die niedrigen Temperaturen ausgesetzt war, einer genauen mikroskopischen Untersuchung zu unterziehen, zu sehen, ob solche Hefe nicht nur Gährung erregt, sondern wirklich auch sprosst, also die der niedrigen Temperatur ausgesetzten Zellen noch lebend geblieben sind (was in den Versuchen von Cagniard-Latour und Melsens noch nicht constatirt wurde), und endlich das Gährvermögen dieser Hefe mit dem solcher, die im normalen Zustande in Gährflüssigkeit gelangte, in genauen Vergleich zu stellen.

Die angewandte Hefe war frische und lufttrockene Presshefe. Die erstere enthielt 73% Wasser¹ und es wurden von ersterer zu jedem Versuche 2 Gramm, von letzterer die der Trockensubstanz dieser 2 Gr. entsprechende Menge genommen.

Die Hefe wurde immer vor und nach dem Versuche einer sorgfältigen mikroskopischen Untersuchung unterworfen und stets für sich, nicht in einer Gährflüssigkeit suspendirt, den niedrigen Temperaturen ausgesetzt.

Zu diesem Zwecke wurde die feinertheilte, abgewogene Hefe in dünnwandige Reagenzröhrchen gegeben, die ich vorher ausgegluhrt und bis zum Gebrauche mit auf 160° C. erhitzter Watte verschlossen hatte. Das Röhrchen mit der Hefe, mit einem neuen direct aus dem Luftbad kommenden Wattenpfropf versehen, gelangte dann in die Kältemischung.

Da aus Vorversuchen sich ergab, dass die in die Hefe eingesenkten Thermometer nach kurzer Zeit genau dieselbe Temperatur anzeigten, wie die Thermometer, die direct in die Kältemischung versenkt wurden, so durfte ich vollkommen beruhigt sein, dass die Angabe der in der Kältemischung eingebrachten Thermometer auch für die Hefe galt, welche, in Eprouvetten verschlossen, in der Kältemischung stand.

Ich unterliess daher das Einsenken von Thermometern in die Hefe selbst um so lieber, da nach dem Aufthauen diese sich stets verflüssigt und am Thermometer haften bleibt. In Folge dessen hätte ich die Eprouvetten öffnen und bei den Gahrver-

¹ Der Wassergehalt wurde bei 120° C. bestimmt.

suchen die Hefe vom Thermometer mit Gährflüssigkeit herunterwaschen müssen. Bei diesen Manipulationen aber hätten unterschieden atmosphärische Keime mit in die Gährflüssigkeit gelangen und so die Genauigkeit der Versuche beeinträchtigen können.

Wir werden später sehen, wie ich mich vor atmosphärischen Keimen beim Einbringen der Hefe in die Gährflüssigkeit sicherstellte.

Da rasches Aufthauen die gefrorene Hefe gefährden soll ¹, so habe ich, um allen Einwendungen von vornherein zu begegnen, dieses stets in der Kältemischung selbst eintreten lassen.

Die Versuche mit der Hefe wurden bei folgenden Temperaturen gemacht:

- Bei + 16° C. (Zimmertemperatur),
- „ + 1° „ (langsam aufthauendes Eis),
- „ — 5° „ (grobgestossenes Eis und Schwefelsäure),
- „ — 18° „ (Eis und Kochsalz),
- „ — 24° „ (Eis und krystallisirtes Chlorecalcium),
- „ — 87·5° „ (feste Kohlensäure allein oder feste Kohlensäure und Äther),
- „ — 113·75° „ (feste Kohlensäure, Äther und luftleerer Raum).

Es soll nur der Manipulationen bei den Versuchen mit fester Kohlensäure hier des Näheren gedacht werden, da die Anwen-

¹ Hoffmann l. c. 351. Ein einziger Versuch, den ich in Bezug auf das Gährvermögen verschieden schnell aufgethaueter Hefe ausführte, ergab Folgendes:

Frische Presshefe, einer Temperatur von — 20° C. ausgesetzt, und in der Kältemischung selbst aufthauen gelassen, wozu ein Zeitraum von etwas mehr wie sechs Stunden nöthig war, verflüssigte sich nach und nach bei +2° der aufgethaueten Kältemischung.

Dieselbe Hefe, in die Zimmertemperatur (16° C.) gebracht, verflüssigte sich nach einigen Minuten. Dieselbe Hefe, in der Eprouvette in Wasser von 25° gebracht, verflüssigte sich fast augenblicklich.

Diese drei Hefeproben zur nämlichen Zeit mit gekochter 10procentiger Zuckerlösung versetzt und gegen Zutritt atmosphärischer Keime geschützt, zeigten nach 24 Stunden verschiedene Gährungsintensität und war letztere am grössten bei jener Hefe, die in der Kältemischung aufthauete, am geringsten bei der Hefe, die von — 20° C. direct auf 25° gebracht wurde.

dung des thauenden Eises und der übrigen Kältemischungen keiner näheren Erläuterung bedarf.

Die Versuche mit fester Kohlensäure wurden im chemischen Laboratorium des Herrn Prof. Dr. Ernst Ludwig angestellt. Ich erachte es für meine Pflicht, dem genannten Herrn hier meinen verbindlichsten Dank auszusprechen für die Unterstützung, die er meiner Arbeit angedeihen liess, indem er mir nicht nur die zur Herstellung der festen Kohlensäure nöthigen Apparate zur Verfügung stellte, sondern mich auch bei den umständlichen Operationen auf das thatkräftigste unterstützte.

So viel mir bekannt, haben Versuche mit so niedriger Temperatur, wie sie durch feste Kohlensäure erzeugt werden kann, nur Cagniard-Latour und Melsens ausgeführt.¹

Cagniard-Latour mischte fein gepulverte trockene Hefe direct mit fester Kohlensäure und liess letztere verdunsten. So, glaubte er, wäre die Hefe einer Temperatur von -60° und vielleicht noch darunter ausgesetzt gewesen.

Für genaue Versuche ist diese Manipulation entschieden unzulässig; denn abgesehen davon, dass auf diese Weise atmosphärische Keime nicht ausgeschlossen sind, fällt noch ein anderer Umstand in Betracht, vorausgesetzt, dass man mit dem Natterer'schen Apparate die feste Kohlensäure erzeugte.

Es ist diese Kohlensäure nämlich stets durch mechanisch beigemengtes Fett verunreinigt.

Der Grund hievon liegt darin, dass von den Schmierölen der Kolbenstange etc. stets etwas beim Pumpen durch das Ventil in den Compressionskolben gelangt. Man kann sich von dieser Verunreinigung auch jederzeit überzeugen, indem man z. B. feste Kohlensäure in einem Becherglas verdunsten lässt. Deutlicher Fettgeruch tritt auf und die Stellen des Glases, mit denen die feste Kohlensäure in Berührung kam, fühlen sich fettig an.

Hefe, in solche Kohlensäure eingestreut, kommt mit dem darin fein zertheilten Fett in Berührung, wird selbst fettig und in Gährflüssigkeit versenkt, schützt die fettige Hülle vor directer Berührung mit der erstern. Die Folge davon ist mindestens eine Gährverzögerung.

¹ l. c.

Melsens hat mit frischer Presshefe experimentirt. Bald mischte er ein Quantum derselben mit fester Kohlensäure — da gelten natürlich auch die bei Cagniard-Latour's Verfahren gemachten Einwendungen — oder aber er umgab die Kugel eines Thermometers mit der Hefe, schmolz dieses in eine Glasröhre, die er in ein Gemisch von fester Kohlensäure und Äther einsenkte, und dann das Ganze unter den Recipienten der Luftpumpe brachte. Das Thermometer zeigte — 91° C.

So war natürlich, wie in meinen Versuchen, die Unreinheit der Kohlensäure gleichgiltig; aus schon erwähntem Grunde aber vermied ich stets das Einsenken des Thermometers in die Hefe selbst.

Die flüssige Kohlensäure wurde auf bekannte Art im Natterer'schen Apparat erzeugt und dann in die Solidificationsbüchse ausströmen gelassen. Die feste Kohlensäure gelangte hierauf (bei den Versuchen, zu welchen ausschliesslich feste Kohlensäure verwendet wurde) in ein Becherglas, das innen mit Watte ausgekleidet war und ebenso auch von aussen mit Watte umgeben wurde, um auf diese Weise ein möglichst langsames Verdunsten zu erzielen.

Die dünnwandigen, wohlverschlossenen, die Hefe bergenden Eprouvetten wurden nun eingesenkt, so dass die ganze Hefesäule von fester Kohlensäure bedeckt war; zwischen den Eprouvetten (es waren deren stets drei, wovon die eine zu Gährversuchen, die anderen zu mikroskopischen Beobachtungen dienten) wurde ein Schwefelkohlenstoff-Thermometer von Kapeller, das bis -200° R. getheilt war, gegeben.

Der Gang der Temperatur war folgender: In etwa 5 Minuten sank das Thermometer von gewöhnlicher Zimmertemperatur auf -70° R., schwankte während einer halben Stunde zwischen -68° und -71° , stieg dann in einer weiteren halben Stunde auf -50° , und nach wieder weiteren 40 Minuten hatte es die Zimmertemperatur 16° C. ($= 12,8^{\circ}$ R.) angenommen.

Bei den Versuchen mit fester Kohlensäure und Äther wurde erstere in ein Becherglas gebracht, das diesmal natürlich nur von aussen mit Watte bekleidet war, die Eprouvetten und Thermometer eingesteckt und nun eine kleine Quantität Äther dazugegeben, worauf sogleich heftiges Aufbrausen erfolgte.

Der Schwefelkohlenstoff im Thermometer sank etwas weniger rasch als bei fester Kohlensäure allein, blieb 20 Minuten auf -71° stehen und stieg dann in 40 Minuten auf $+16^{\circ}$ C. (Zimmertemperatur).

Bei Benützung des luftleeren Raumes wurde das Becherglas mit fester Kohlensäure und Äther gefüllt, in das Gemenge der beiden letzteren Thermometer und Eprouvetten eingesenkt, und das Ganze ohne Umhüllung unter den Recipienten der Luftpumpe gebracht. Das Manometer sank bei raschem Evacuiren nach und nach auf $1-1\frac{1}{2}$ Zoll. Das Thermometer fiel schnell auf -91° ($= 113,75^{\circ}$ C.) und zeigte diese Temperatur während 15 Minuten. Als das Aufbrausen nachgelassen, wurde der Recipient weggenommen und das Becherglas auf eine poröse Porzellanplatte gestellt. In etwa 50 Minuten hatte auch hier die Annahme der Zimmertemperatur stattgefunden.

Wie wir sehen, war also die Dauer der Einwirkung der Minima dieser Temperaturen in den einzelnen Versuchen eine verschiedene und muss ich hier bemerken, dass dies auch bei den übrigen Versuchen mit den weniger niederen Temperaturen der Fall war.

Über den Einfluss, den die Zeitdauer des Gefrorenseins auf die Hefe ausübt, habe ich keine directen Versuche angestellt; doch glaube ich annehmen zu dürfen, dass ein solcher Einfluss mindestens innerhalb enger Zeitgrenzen nicht existirt.¹

Über die morphologischen Veränderungen, welche die Hefezellen bei dem Gefrieren und Aufthauen erleiden.

Bemerken wir gleich, dass lufttrockene Presshefe auch durch die intensivsten Kältegrade nicht die geringste bemerkbare Veränderung zeigte.

¹ Siehe hierüber landwirthsch. Versuchsstation von Nobbe 1860, Bd. 2: Sachs, „Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen“. Hier heisst es unter anderem p. 181: „Theoretisch ist es im allgemeinen unwahrscheinlich, dass die Dauer des Erstarrens (der Pflanzentheile) von Einfluss sein könne, da ja die Änderungen nur im Acte des Erstarrens und Aufthauens eintreten können, während im erstarrten Zustand aber wesentliche Änderungen kaum möglich sind.“

Frische Presshefe liess hingegen von -5°C . angefangen zunächst die Veränderung erkennen, dass sie steinhart wurde. Auch beim sorgfältigsten Auftauen (in der Kältemischung selbst) zerfloss dann diese Hefe stets, und meist begann dies Zerfliessen bei $+2^{\circ}\text{C}$.

Die Hefe, die einer Temperatur von -5° ausgesetzt war, zerfloss nicht in dem Grade wie die übrigen. Das Auftauen bewirkte mehr ein starkes Erweichen.

Die gefrorenen Hefezellen direct (d. h. ohne Präparirflüssigkeit) beobachtet, enthielten äusserst selten noch Vaenolen. Dimensionsmessungen konnten an solchen Präparaten nicht leicht gemacht werden. Ich präparirte deshalb diese Hefe in 10procentiger Zuckerlösung und verglich sie mit normaler Hefe, die ich gleichfalls in 10procentiger Zuckerlösung vertheilte.

Es ergab sich, dass das Volumen der gefrorenen und dann aufgethauten Hefezellen sich im Ganzen verringert hatte.

Von der Hefe, die einer Temperatur von -18°C . ausgesetzt war, zeigten die elliptischen Zellen im Durchschnitt eine Verkleinerung der beiden Durchmesser von 0.0025 Mm.; von der Hefe, die den Temperaturen von -87° und $-113,75^{\circ}\text{C}$. ausgesetzt waren, betrug die Verkleinerung für den Längsdurchmesser 0.00233 Mm. und für den Querdurchmesser 0.00176 Mm.

Auch zeigten sich bei diesen Hefeproben immer relativ mehr Zellen mit contrahirtem Protoplasma.

In gefrorenen, vaenolenfreien Hefezellen, auch wenn sie in 10% Zuckerlösung gebracht wurden, traten nicht immer wieder Vaenolen auf.

Über die Fähigkeit der gefrorenen und wieder aufgethauten Hefe zu sprossen, werde ich im nächsten Abschnitte sprechen, und bemerke hier nur noch, dass auch bei der tiefsten Temperatur, die ich auf Hefe einwirken liess, nämlich $-113,75^{\circ}\text{C}$.¹, die fast immer in der Hefe befindlichen Bacterien nicht getödtet wurden.

¹ Es ist dies meines Wissens die niedrigste Temperatur, die man bis jetzt auf Hefe einwirken liess.

Die Erseheinung des Zusammenfrierens der Hefe zu harten, eisigen Klumpen, und das beim Aufthauen sich einstellende Breiigwerden der Hefe scheint auf folgende Weise stattzufinden:

Die Zellen ziehen sich, wie oben zahlenmässig erwiesen wurde, in Folge der niederen Temperaturen zusammen. Gleichzeitig erfolgt eine Desorganisation des Protoplasma sowohl als der Zellwand; beide verlieren ihre hohe Imbibitionsfähigkeit, die Zellwand auch ihren hohen Filtrationswiderstand.

Dass die Imbibitionsfähigkeit des Protoplasma und der Zellwand gefroren gewesener Hefezellen wirklich eine geringere geworden, geht wohl daraus hervor, dass die Zellen, welche in Folge der niedern Temperatur sich zusammengezogen hatten, beim Aufthauen in Wasser oder Zuckerlösung selbst nach Tagen oder Wochen nicht mehr ihre normale Grösse annehmen.

Beim Aufthauen dehnt sich nun der Zellinhalt mehr als die Zellwand aus, in Folge welchen Umstandes ein Theil der Zellflüssigkeit durch die Membran hindurchtritt und das Breiigwerden der im normalen Zustand teigigen Hefe bedingt.

Es ist aber auch nicht undenkbar, dass die molecularen Veränderungen, welche Protoplasma und Zellmembran erleiden, erst während des Aufthauens stattfinden.

Dass das Heraustreten der Zellflüssigkeit aus den Hefezellen nicht etwa blos durch Volumenveränderung, unabhängig vom Gefrieren, hervorgebracht wird, geht daraus hervor, dass das Breiigwerden der Hefe nur eintritt, wenn die Hefe früher wirklich durch Eisbildung hart geworden war.

Versuche über die Fähigkeit gefroren gewesener Hefezellen zu sprossen und Gährung einzuleiten.

Wir haben also gesehen, dass die einzige morphologische, makroskopisch bemerkbare Veränderung, die die Presshefe durch Aussetzen von Temperaturen unter -5°C erleidet, in einer Verflüssigung derselben beim Aufthauen besteht, und dass mikroskopisch eine Verkleinerung der Hefezellen und Verschwinden der Vacuolen nachweisbar ist. Ein Zerreißen der Membran der Hefezellen habe ich niemals beobachtet.

Cagniard-Latour und Melsens haben nachgewiesen, dass auch bei sehr niedern Temperaturen gefroren gewesene

Hefe Gährung einzuleiten im Stande ist. Da nun die Versuche von M. Manassein gelehrt haben, dass todte Hefe eine begrenzte Menge von Zucker in die Gährungsproducte umzuwandeln vermag, so ist durch die Versuche der beiden erstgenannten Forscher noch nicht bewiesen, dass die Hefe das Gefrieren lebend überdauert. Man wird nur dann berechtigt sein, die Hefezellen als lebend anzusehen, wenn sie in Zuckerlösung unter ihren gewöhnlichen Vegetationsbedingungen sprosst.

Um die Sprossung einzuleiten, wurde Hefe unter den oben genannten Vorsichten zum Ausschluss atmosphärischer Keime zum Gefrieren gebracht, unter den gleichen Vorsichten in eine 10procentige Zuckerlösung versenkt und unter Watteverschluss 24 Stunden stehen gelassen.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gefässe geöffnet und die Hefezellen mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der gefroren gewesenen Hefezellen sich gar nicht verändert hatte (d. h. seit der mikroskopischen Untersuchung, die mit der Hefe vorgenommen wurde, bevor sie in die Gährflüssigkeit gebracht wurde), während der Rest der Zellen sprosst und häufig sogar reich gegliederte Zellcolonien bildete. Die einer Temperatur von -113.75° ausgesetzte Hefe verhielt sich anscheinend in Bezug auf Sprossbildung so, wie die auf -87° abgekühlte.

Was nun die Bestimmung des Gährvermögens der gefrorenen Hefe betrifft, so wurden, wie schon erwähnt, für frische Presshefe, die 73% Wasser enthielt, stets 2 Gr. genommen.

Da nicht alle Versuche zugleich gemacht werden konnten, mithin nicht immer mit der nämlichen Hefe, wenn auch immer mit Hefe aus der nämlichen Fabrik experimentirt wurde, so wurde bei jeder neuen Versuchsreihe erst der Wassergehalt der anzuwendenden Hefe bestimmt, und nach diesem die typischen 2 Gr. corrigirt.

Wurde trockene Presshefe auch in Betracht gezogen, so wurde, wie schon erwähnt, eine der Trockensubstanz der angewandten frischen Hefemenge entsprechende Quantität genommen.

Dadurch sollte mehr Gleichförmigkeit in die Versuche gebracht werden. Da aber die Gährkraft der Presshefe nicht allein von ihrem Wassergehalt, sondern von vielen, und meist noch unbekanntem Factoren abhängig ist, so lassen sich aus meinen,

weiter unten folgenden Versuchsreihen wohl allgemeine Schlüsse ziehen; hingegen sind genaue Vergleiche der Wirkungen niedrigerer Temperaturen auf Hefe betreffs des Gährungsvermögens nur zwischen Gliedern einer und derselben Reihe zulässig.

Die Gährungsintensität der auf verschiedene Temperaturen gebrachten Hefeproben wurde dann durch die Menge der entwickelten Kohlensäure bestimmt und zwar durch directe Wägung der mit den Gährapparaten in Verbindung gesetzten Kaliapparate.

Die angewandten Apparate waren alle folgendermassen zusammengestellt:

Ein etwa 200 Cc. fassendes Kölbchen wurde mit einem doppelt durchbohrten Kautschukpfropf wohl verschlossen. Eine Bohrung diente zur Aufnahme des Chlorecalciumrohres, so dass also nur trockene Kohlensäure in den durch einen Kautschukschlauch mit ihm verbundenen Kaliapparat gelangen konnte. Der letztere war seinerseits durch ein Chlorecalciumrohr und einen Kolben mit Kalilauge von atmosphärischer Feuchtigkeit und Kohlensäure isolirt.

In die zweite Bohrung wurde ein knieförmig gebogenes Röhrechen eingepasst, das während des Versuches selbst geschlossen, vor jeder Wägung des Kaliapparates aber mit einem Chlorecalciumrohr und einem Kolben mit Kalilauge in Verbindung gebracht wurde, um durch den am andern Ende des Apparates, am Kalikolben angebrachten Aspirator nur trockene und kohlenstofffreie Luft durchziehen zu lassen.

Die Kölbchen dienten zur Aufnahme von Gährflüssigkeit, und als letztere benützte ich in allen Versuchen 10procentige Zuckerlösung.

Reine Krystalle von weissem Kandiszucker wurden zu diesem Zwecke in der Hälfte des zur 10procentigen Lösung nöthigen Wassers aufgelöst, die Lösung filtrirt und das Filter mit der andern Hälfte Wassers ausgewaschen, dann wurde während zwei Stunden die Lösung gekocht, die verdampfte Menge des Wassers durch eine entsprechende Quantität siedenden destillirten Wassers ersetzt und der Kolben mit einem bis auf 160° erhitzten Wattenpfropf verschlossen.

Die Gährkölbchen selbst wurden vor den Versuchen stets durchgeglüht, bis zum Erkalten mit besagter Watte verschlossen, dann mit 75 Cc. 10procentiger Zuckerlösung versetzt, letztere für kurze Zeit zum Sieden gebracht, das Kölbchen wieder mit einem frischen Wattenpfropf versehen, und nachdem die Flüssigkeit die Zimmertemperatur angenommen hatte, wurde die Hefe eingegeben.

Dies letztere geschah nun in der Weise, dass ich die direct aus der Kältemischung kommende, sorgfältig gereinigte, die Hefe enthaltende Epronvette durch den Wattenpfropf durchsteckte, dann mit einer Zange die obere Hälfte abklemmte, so zwar, dass die untere Hälfte in die Gährflüssigkeit fiel. Der Wattenpfropf wurde schnell durch den obengenannten Kautschukpfropf ersetzt, die Verbindung des Gährkölbchens mit dem Kaliapparate hergestellt und dann das Kölbchen sorgfältig geschwenkt, damit die Hefe aus dem Glasröhrchen herausgespült würde. Es gelang dies stets auch vollständig.

Alle 24 Stunden wurde dann auf der einen Seite der Aspirator angesetzt, auf der andern das Chlorealciumrohr und der Kalikolben etwa 10 Minuten aspirirt und dann wurden die Kaliapparate gewogen.

Ich bin mir wohl bewusst, dass ein absolut sicherer Ausschluss der atmosphärischen Keime bei den mit diesen Apparaten vorgenommenen Gährversuchen nicht Statt hatte.

Um aber den etwaigen Einfluss eingedrungener atmosphärischer Keime zu der Gährflüssigkeit kennen zu lernen, benützte ich einen ebenso adjustirten Apparat, der wohl mit Zuckerlösung, aber nicht mit Hefe versetzt, allen jenen Manipulationen, wie die eigentlichen Gährapparate, unterworfen wurde. Da sich nach Schluss der Gährversuche zeigte, dass in diesem Controllapparat keine wägbare Menge von Kohlensäure sich gebildet hatte, so war ich berechtigt anzunehmen, dass meine Gährversuche durch Eindringen atmosphärischer Keime nicht gestört wurden.

Das theoretische Maximum für die Kohlensäuremenge, welche die zur Vergährung genommene Quantität Zucker (75 Cc. 10% Zuckerlösung = 6.81 Gr. Zucker) liefert, beträgt 3.5 Gr.

Um den Gang der Gährung besser zur Anschauung zu bringen, will ich hier einige Versuchsreihen folgen lassen.

Menge der entwickelten Kohlensäure.

Nach	1 Tag	Frische Presshefe bei +16° C.	Frische Presshefe abge- kühlt auf — 5° C.	Frische Presshefe abgekühlt auf — 24° C.
	2 Tagen	0.435 Gr.	0.105 Gr.	0.011 Gr.
"	"	0.749 ¹⁾ "	0.319 "	0.134 "
"	3 "	1.168 "	0.743 "	0.316 "
"	4 "	1.438 "	1.182 "	0.494 "
"	5 "	1.685 "	1.564 "	0.659 "
"	6 "	1.884 "	1.884 "	0.903 "
"	7 "	2.020 "	2.040 "	1.119 "
"	8 "	2.100 "	2.191 "	1.340 "
"	9 "	2.157 "	2.452 "	1.506 "
"	10 "	2.180 "	Keine weitere Gasentwicklung;	1.719 "
"	11 "	2.205 "		1.867 "
"	12 "	2.328 "		1.882 "
"	13 "	2.343 "		2.009 "
"	14 "	2.353 "		2.104 "
"	15 "	2.358 "		2.190 "
"	16 "	2.365 "		2.250 "

¹⁾ D. h. nach 2 Tagen war die Gesamtmenge der Kohlensäure, welche

Versuchen gebildet wurde, gleich 0.749 Gr.

Nach	Frühe Presshefe + 16° C.	Frühe Presshefe abgekühlt auf — 5° C.	Frühe Presshefe abgekühlt auf — 24° C.
Nach 17 Tagen	2-365 Gr.		2-304 Gr.
" 18 "	Von nun ab war keine weitere Gasentwicklung bemerktbar.		2-355 "
" 19 "			2-392 "
" 20 "			2-407 "
" 21 "			2-423 "
" 22 "			2-438 "
" 23 "			2-449 "
" 24 "			2-457 "
" 25 "			2-461 "
" 26 "			2-464 "
" 27 "			
	Keine weitere Gasentwicklung.		
Nach	Frühe Presshefe bei + 16° C.	Frühe Presshefe abgekühlt auf + 1° C.	Frühe Presshefe abgekühlt auf — 18° C.
Nach 1 Tag	0-935	0-988	0-730
" 2 Tage	1-810	0-998	0-485
" 3 "	2-780	2-985	2-498
" 4 "	3-105	3-300	3-000
" 5 "	3-520	3-470	3-247
" 6 "		3-360	3-295
			0-350
			1-112
			2-397
			3-019
			3-227
			3-295
			0-105
			1-135
			2-415
			3-037
			3-272
			3-362

Nach 7 Tagen		FrISChe Presshefe bei + 16° C.	FrISChe Presshefe abgekühlt auf + 1° C.	FrISChe Presshefe ab- gekühlt auf — 18 C.	FrISChe Presshefe bei + 15° C.	FrISChe Presshefe — 16° C.
"	8 "			3-495	3-355	3-442
"	9 "				3-404	3-491
"	10 "				3-413	
"	11 "				3-484	
"	"				3-502	
Nach 1 Tag		FrISChe Presshefe bei + 16° C.	FrISChe Presshefe abgekühlt auf — 87.5° C.	FrISChe Presshefe abge- kühlt auf — 113° 75 C.	FrISChe Presshefe bei + 16° C.	FrISChe Presshefe abgekühlt auf — 113, 75 C.
"	2 Tagen	0-558	0-110	0-099	0-015	0-081
"	3 "	0-929	0-445	0-398	0-102	0-564
"	4 "	1-183	0-769	6-997	0-255	1-010
"	5 "	1-355	1-019	1-345	0-425	1-447
"	6 "	1-480	1-237	1-727	0-637	1-641
"	7 "	1-548	1-342	1-855	0-708	1-716
"	8 "	1-585	1-401	1-923	0-869	1-786
"	9 "	1-625	1-440	1-979	0-982	1-796
"	10 "	1-650	1-467	2-017	1-053	1-818
"	11 "	1-662	1-480	2-043	1-113	
"	12 "	1-671	1-488	2-056	1-147	
"	13 "	1-680	1-494	2-062	1-171	
"	"	1-689	1-498	2-069	1-185	

Nach 14 Tagen	Frische Presshefe bei + 16° C.	Frische Presshefe abgekühlt auf — 87° 5 C.	Frische Presshefe abge- kühlt auf — 113° 75 C.	Trockene Presshefe bei + 16° C. abgekühlt auf — 113° 75 C.
15	1·692	1·500	2·072	1·194
"	1·696	1·503	2·075	1·197
"	1·701	1·516	2·080	1·208
"	1·706	1·629	2·090	1·213
"	1·713	1·547	2·099	1·218
"	1·730	1·563		1·222
"	1·749	1·583		1·227
"	1·757	1·599		1·233
"	1·771	1·611		1·235
"	1·789	1·632		1·236
"	1·811	1·647		
"	1·857	1·653		
"	1·883	1·655		
"		1·678		
"		1·696		
"		2·700		
"		2·718		

Aus diesen Tabellen geht auf das bestimmteste hervor, dass die Gährkraft der frischen Presshefe durch das Gefrieren nicht vernichtet, sondern nur verringert wird, und dass die lufttrockene Presshefe diese Einbusse an Gährvermögen nicht erleidet.

Nach dem Aufhören der Alkoholgährung liess sich in der Flüssigkeit stets noch Zucker nachweisen (durch das Trommersche Reagens) und bei der Hefe, die auf ihr Gährvermögen und auf ihre morphologischen Verhältnisse geprüft wurde, ergab sich, dass sie, in frische Gährflüssigkeit gebracht, die Fähigkeit, Gährung einzuleiten, verloren hatte.

Die Mehrzahl der Hefezellen war isolirt, niemals zeigte sich mehr neu angelegte Sprossung; die Hefezellen hatten ihr normales Aussehen verloren; das Protoplasma war fast durchgehends vacuolenfrei, körnig und meist contrahirt. Neben der Alkoholhefe fanden sich fast immer aber Vibrionen und Bacterien.

Die Erscheinung der Gährverzögerung von Zuckertlösungen, welche mit gefroren gewesener Hefe versetzt wurden, kann folgendermassen ihre Erklärung finden:

Ich habe schon früher bemerkt, dass bei der Hefe, die niedrigen Temperaturen ausgesetzt war, fast immer viele collabirte Zellen mit contrahirtem Protoplasma zu finden waren. Durch das Gefrieren wurde also eine grosse Zahl der Hefezellen getödtet, denn alle Zellen, mit von der Zellwand abgelöstem Protoplasma sind zweifellos todt; ¹ nie gelingt es nämlich, dieselben zur Sprossung zu bringen, noch nehmen sie beim Liegen in Gährflüssigkeit das Aussehen normaler Hefezellen an. Die jüngern, mit kleinen Vacuolen versehenen, oder noch vacuolenfreien Hefezellen bleiben hingegen sichtlich durchgehend lebend und bilden den Ausgangspunkt für neue Generationen von Hefezellen.

Im Beginn der Gährung functioniren hauptsächlich die todtten Hefezellen, welche überhaupt nur eine beschränkte und erwiesenermassen relativ geringe Zuckermenge zu vergähren

¹ Wiesner, Mikrosk. Unters. I. e. p. 106.

vermögen; im Verlauf der Gärung steigert sich die Menge lebender Hefezellen und es muss so eine Steigerung der Intensität in der Gärung eintreten. Schliesslich holt die gefroren gewesene Hefe in ihrem Gährvermögen die frische Hefe ganz oder nahezu ein.

In einzelnen Fällen vergährte merkwürdigerweise die gefroren gewesene Hefe ein grösseres Zuckerquantum als die normale, was wohl nur so zu erklären sein dürfte, dass die relativ grössere Neubildung von Zellen eine verhältnissmässig stärkere Gärung zur Folge hat. (Vergleiche hierüber namentlich den Gährverlauf der einer Temperatur von $-113^{\circ} 75$ C. ausgesetzten frischen Presshefe, dritte Versuchsreihe.)

Interessant ist, dass auch die Versuche über den Einfluss niederer Temperaturen auf Hefe dasselbe lehren, was auch die Versuche über den Einfluss sehr hoher Temperaturen, und jene über rasche Zufuhr und Entziehung von Wasser uns zeigen: dass nämlich alle diese die Hefe im Ganzen schädigenden Einflüsse die herangewachsenen Hefezellen viel rascher und intensiver angreifen, als die jüngeren und unerwachsenen. Letztere widerstehen der Kältewirkung ganz oder zum Theil und bilden den Ausgangspunkt für neue Hefegenerationen.

Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich also folgendes:

1. Die bis jetzt auf Presshefe angewandten niederen Temperaturen (bis $-113^{\circ} 75$ C.) haben eine vollständige Tödtung der Hefezellen nicht zu bewirken vermocht.

2. Das Gefrieren der frischen Presshefe vermindert die Gährkraft derselben.

3. Tiefere Kältegrade als -5° C. beeinträchtigen nur in geringem Grade das Gährvermögen der Hefe.

Ich bedauere, dass es mir nicht mehr vergönnt war, Temperaturen unter $-113^{\circ} 75$ C. auf Hefe einwirken zu lassen, wie dieses durch festes Stickstoffoxydul, das man mit Schwefelkohlenstoff betropft, hätte geschehen können.

Nachdem wir aber gesehen, von wie geringem Einfluss selbst eine Temperatur von $-113^{\circ} 75$ C. auf die frische Presshefe war, ja eine bei dieser Temperatur gefrorene Hefe sich kaum anders als eine bei -5° C. gefrorene Hefe verhielt, so ist von

einer Temperatur von -140°C . wohl kaum eine Tödtung der Hefezellen zu erwarten und es dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach die untere Tödtungstemperatur der Hefe uns noch so lange unbekannt bleiben, als es der Wissenschaft nicht gelingt, Temperaturen zu erzielen, die diejenige von -140°C . noch bedeutend übertreffen.

Zum Schlusse habe ich noch die angenehme Pflicht zu erfüllen, meinem hochverehrten Lehrer, dem Vorstande des pflanzen-physiologischen Instituts der k. k. Universität, Herrn Professor Dr. J. Wiesner, der mich bei der vorliegenden Arbeit mit grösster Bereitwilligkeit und fortwährend unterstützte, meinen tiefgefühlten Dank auszusprechen.

Wien, im Juni 1874.
